6481(14)

373-377

动 物 学 研 究 1995，16（4）：373—377 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

大鼠不同脑区突触体钙水平的年龄差异*

王良斌 张维宁 邵 悦 杜红燕 王金晞** 吴馥梅
（南京大学生物科学与技术系 210093）

Q959.837

A

摘要 本实验使用荧光指示剂Fura-2与Tb^{3+}，检测了不同年龄组大鼠的不同脑区（海马、皮层、间脑、小脑）突触体内游离钙与膜结合钙水平。结果显示，与青年对照组相比，老年大鼠大部分脑区（海马、皮层、间脑）突触体内游离钙水平显著增高，尤其是海马突触体内游离钙增高极为显著；其突触体膜结合钙水平表现为：海马、小脑两脑区明显升高，而皮层、间脑两脑区明显下降，呈现一种全脑范围内的钙水平失衡。提示动物的衰老与其脑内钙自体平衡失调有关。

关键词 年龄，大鼠脑，突触体，Ca^{2+} 钙

细胞内钙离子(Ca^{2+})水平的变化在细胞各种机能活动中起开关式作用，是细胞生理功能的重要物质基础，其微小变化可引起一系列生理性乃至病理性改变。生物体衰老过程中伴有Ca^{2+}自体平衡失调，对老化和早老性痴呆病人的研究(Landfield，1989)发现，在含有神经纤维缠结的脑细胞和来源于早老性痴呆病人的成纤维细胞内均见到钙的堆积，引起钙内流增加的主要原因是脑细胞内钙缓冲、钙外排或重摄取机制的改变。有研究指出，细胞内钙浓度过高或钙超负荷会使钙依赖性生理生化反应超常运转，耗竭ATP，产生自由基，直至引起细胞死亡(Blausten，1988)。

突触(synapses)是神经信息传递的关键部位，参与各种神经细胞的生理、病理活动。突触体(synaptosome)保留着原位突触的机能特性，象一般细胞一样，有完整的膜，内含各种细胞器和胞浆。突触膜上有离子通道，仍具有生理活性，对突触体内外Ca^{2+}的平衡起调节作用，类似于完整的活细胞(Whittaker，1972)。因此，突触体是在离体条件下探讨神经系统生理或病理机制常用的实验材料。本实验是在过去工作的基础上，对不同年龄大鼠不同脑区突触体内游离钙和膜结合钙水平同时进行了对应观测，以探讨动物在自然衰老过程中不同脑区突触体钙水平的变化规律。

1 材料与方法

1.1 突触体内$[Ca^{2+}]_i$的测定

1.1.1 突触体的制备 实验动物采用SD雄性大白鼠，分青年组(3月龄)和老年组（26月

*江苏省科学技术委员资助项目
**南京大学配位化学国家重点实验室
本文1994年10月7日收到，1995年3月27日修回

龄)。突触体的分离根据 Hajos 的方法(1975)，并略有改进。分离大鼠的皮层、海马、间脑及小脑，将组织称重，加入 9 倍体积(1 g／9 ml)的 0.32 mol／L 蔗糖溶液(含 10 mmol／L 葡萄糖，pH7.4)，用 Teflon 玻璃匀浆器进行匀浆，10 次上下，850 r／min，所有操作均在 0—4℃进行。匀浆液 1500 r／min 离心 10 min，上清液再于 9500 r／min 离心 20 min，得到 P_2 组分。

将 P_2 组分用 0.32 mol／L 蔗糖液(1 g 湿脑重／1 ml 蔗糖液)缓慢再悬浮起来(10 次上下，400 r／min)。取 P_2 悬浮液按 4 ml P_2 悬液／15 ml 0.8 mol／L 蔗糖液的比例将 P_2 悬液小心铺在 0.8 mol／L 的蔗糖液面上，再于 9500 r／min 离心 30 min，收集 0.8 mol／L 蔗糖相的组分，再缓慢地用 3 倍体积的冰冷的 Na^+介质(mmol／L)：132 NaCl，1 KCl，1.4 $MgCl_2$，1.2 NaH_2PO_4，10 glucose 和 10 Hepes-Na，pH 7.4 稀释。稀释后，突触体悬液再于 20000 r／min 离心 20 min，取沉淀并用 Na^+介质清洗，再用 Na^+介质悬浮起来，使蛋白浓度为 10—15 mg／ml。突触体悬液制备好以后应保存在 0—4℃，并应在分离后 2—3 h 内进行实验。制得的突触体经电镜观察鉴定(图 1)，与文献报道一致，具有生理活性。

1.1.2 *染料负载和荧光测定* 将突触体(2.2 mg／ml)与 3.0 μmol／L(终浓度)的 Fura-2／AM (在 Na^+介质中)于 25℃下孵育 25 min(同时轻摇)，随后再于 30℃孵育 5 min。加入 9 倍体积的冰冷的 Na^+介质使其终止孵育，然后立即进行离心 (9500 r／min，10 min)，洗涤后，将突触体沉淀再用 Na^+介质悬浮起来(5.5 mg／ml，并再于 25℃孵育 5 min，以使 Fura-2／AM 进一步水解完全)。

在 30℃条件下，取一小部分突触体悬液(0.11—0.12 mg／ml，终蛋白浓度)转移至测量皿中，立即采用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统测定其荧光强度，激发波长分别为 340 nm 和 380 nm，发射波长为 505 nm。根据荧光比值由下式计算胞内 $[Ca^{2+}]_i$ (Grynkiewicoz，1985)：

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F_D / F_S) \times [(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$$

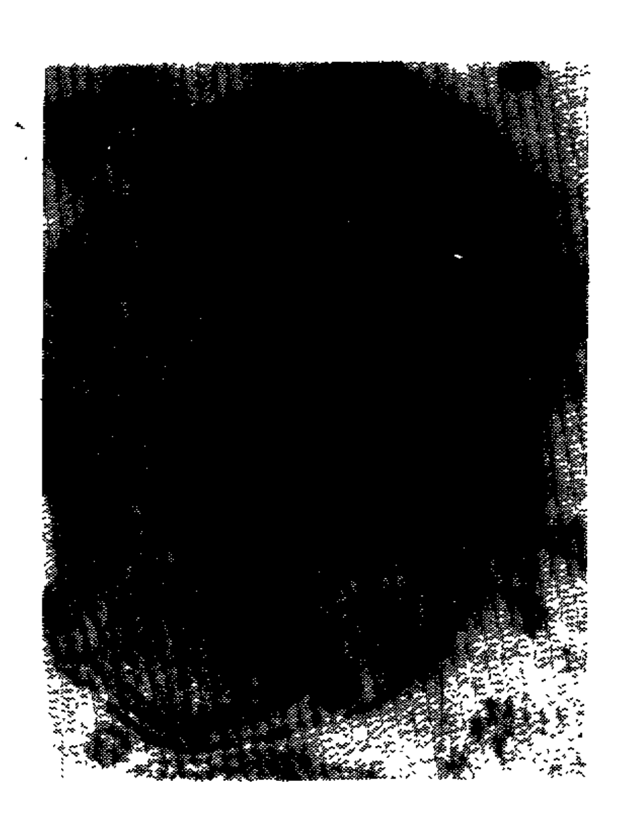


图 1 电镜观察分离制备的突触体(×50000)

Fig. 1 Separated synaptosomes under the electron-microscope in vitro

式中，R 是实验观察到的荧光比值(F_{340}/F_{380})，K_d 是 Fura-2 与 Ca^{2+}反应的解离常数，R_{max} 是胞内 Fura-2 全部为 Ca^{2+}饱和时的荧光比值(采用 Ca^{2+}离子载体将胞外 Ca^{2+}载入细胞内来获得)，R_{min} 为 Fura-2 完全未结合 Ca^{2+}时的荧光比值(通过向介质中加入过量的钙螯合剂 EGTA 将 Ca^{2+}

螯合来获得)，F_D 和 F_S 分别代表无 Ca^{2+}和 Ca^{2+}饱和状态下 380 nm 处的荧光强度。在没有负载 Fura-2 时测定细胞的自发荧光，计算 Ca^{2+}浓度之前须减去细胞自发荧光和背景荧光，根据荧光比值，使用 DM3000 软件，计算突触体内$[Ca^{2+}]_i$。

1.2 突触体膜结合钙的测定

突触体按前法制备，采用染料-蛋白结合法测定蛋白浓度，取突触体悬液，再加 6 次甲基四胺缓冲液，4℃过夜，次日；加入 0.2 ml $TbCl_3$ 溶液(0.2 mol／L)，37℃水浴 1 h，用 Hitachi RF-540 型荧光分光光度仪(λem＝545 nm，λex＝295 nm)测定突触体膜结合 Tb^{3+}的荧光强度，以间接观察突触膜结合 Ca^{2+}的变化。因 Tb^{3+}竞争性结合突触体膜上的 Ca^{2+}结合位点，所以突触体膜结合 Tb^{3+}荧光强度的增强即反映了突触体膜结合 Ca^{2+}水平的降低。

Fura-2／AM 为 Sigma 公司产品，用二甲亚砜(DMSO)配成 0.25 mmol／L 贮备液，分装后置-20℃避光保存。N-2-羟乙基哌嗪-N′-2′-乙烷磺酸(Hepes)为进口分装(上海生化试剂商店)。AR-CM-MIC 阳离子测定系统为美国 Spex 公司产品，与其配套使用的 Diapho-TMD 型荧光倒置显微镜，为日本 Nikon 公司产品。

所有数据经方差分析后采用 t-检验处理。

2 结　果

2.1 衰老对大鼠脑突触体内游离$[Ca^{2+}]_i$ 的影响

结果显示(表 1)，老年组海马、皮层、间脑 3 个脑区突触体内$[Ca^{2+}]_i$ 均显著高于青年对照组，且海马脑区突触体内$[Ca^{2+}]_i$ 呈极显著升高。而小脑突触体内$[Ca^{2+}]_i$ 呈现相反趋势，即老年组显著低于青年组。说明随着动物的衰老，大部分脑区钙水平升高，但也有部分脑区钙水平下降，呈现一种全脑范围内的钙水平失衡。

2.2 衰老对大鼠脑突触体膜结合钙的影响

从表 2 可以看出，老年组海马、小脑两个脑区的突触体膜 Tb^{3+}-荧光强度极显著降低，即突触体膜结合钙极显著高于青年组($P<0.01$)，而对于皮层、间脑两个脑区，老年组突触体膜

表 1　大鼠脑突触体内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定

Tab. 1　Measurement of synaptosomal free calcium ion concentration in various rat brain regions

脑　区	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol／L)	
	青年组	老年组
海马	112.4±17.3(n＝8)	302.4±40.6** (n＝10)
皮层	88.8±20.7 (n＝14)	105.2±17.9* (n＝16)
小脑	131.5±16.7 (n＝11)	104.5±7.1* (n＝6)
间脑	93.8±12.9 (n＝14)	112.2±30.2* (n＝12)

表中数据为 Means±SD (values in the Table are mean±SD)

* $P<0.05$，** $P<0.01$，与青年组相比(vs the young group)。

表 2　大鼠脑突触体膜结合钙的测定

Tab. 2　Measurement of synaptosomal membrane protein-bound Ca^{2+} in various rat brain regions

脑区	Tb^{3+}相对荧光强度	
	青年组	老年组
海马	21.3±1.46 (n＝8)	18.8±1.04** (n＝8)
皮层	18.6±2.18 (n＝8)	22.8±4.45* (n＝16)
小脑	20.5±1.97 (n＝16)	16.3±0.60** (n＝8)
间脑	24.0±3.34 (n＝8)	27.4±1.56* (n＝8)

表中数据为 Means±SD (values in the Table are means±SD)

* $P<0.05$，** $P<0.01$，与青年组相比(vs the young group)。

Tb^{3+}-荧光强度显著高于青年组，亦即老年组的这两个脑区突触体膜结合钙显著低于青年组($P<0.05$)。

3 讨论

生物体衰老过程中伴有钙自体平衡失调，对大鼠的电生理学研究发现。老年大鼠的钙依赖性突触可塑性受到损伤，推测其根源可能就是脑细胞内游离钙浓度过高。本室过去实验证实：记忆相关脑区海马内钙水平过高或过低均有损动物记忆巩固过程(张维宁等，1994)，而给有老年性记忆障碍的动物喂服钙拮抗剂可改善其学习记忆能力(Daniel，1991；Deyo，1989)。本实验测定了自然衰老状态下的动物脑内钙水平、结果表明，与青年对照组相比，衰老大鼠大部分脑区(海马、皮层、间脑)突触体内游离钙水平显著增高，尤其是海马突触体内游离钙增高极为显著；而小脑突触体内游离$[Ca^{2+}]_i$呈现相反趋势，即老年组显著低于青年组。其突触体膜结合钙水平表现为：海马、小脑两脑区明显升高，而皮层、间脑两脑区明显下降。说明随着动物的衰老，大部分脑区钙水平升高，但也有部分脑区钙水平下降、呈现一种全脑范围内的钙水平失衡。对于记忆相关脑区海马来说、其突触体内游离钙及突触体膜结合钙均极显著升高，即出现所谓"钙堆积"，提示衰老动物的学习记忆障碍与脑内尤其是海马突触体内钙水平过高有关；而小脑脑区突触体内游离钙和膜结合钙的不均衡分布、似又与衰老动物行为迟缓、动作不灵活相关。

参 考 文 献

张维宁，陆汉新，吴馥梅等，1994，海马内钙离子水平对小鼠记忆巩固的影响．中国药理学通报，10(4)：262—267.

Blausten M P，1988．Cellular calcium：Nervous System．In：Nordin BEC，ed．Calcium in Human Biology London：Springer-Verlag，357-358

Daniel A L，1991．Learning and memory，*Brain Research Reviews*，(16)：193.

Deyo R A，Straube K T，Disterhoft J F，1989 Nimodipine faciliates associate learning in aging rabbits．*Science*，(243)：809

Grynkiewicoz G，Poenie M，Tsien R Y，1985．A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluresence properties．*J Biol Chem*，(260)：3440-3450.

Hajos F，1975 An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity．*Brain Res*．(93)：485-489.

Landfield P W，1989．Calcium homeostasis in brain aging and Alzheimer's disease．In：Bergener M and Reisberg，eds Diagnosis and Treatment of Senile Dementia Berlin：Springer-Verlag，276-285.

Whittaker V P，1972．Structure and Function of Synapses New York：Raven Press，87-100.

AGE–DEPENDENT CHANGES OF SYNAPTOSOMAL CALCIUM IONS IN DIFFERENT RAT BRAIN RIGIONS

Wang Liangbin Zhang Weining Shao Yue Du Hongyan
Wang Jinxi* Wu Fumei

(Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract

In this experiment, the synaptosomal free calcium concentration and synaptosomal membrane protein–bound Ca^{2+} in various brain regions were measured by using fluorescence indicator Fura–2/AM and Tb^{3+} respectively. Compared with that of 3–month–old rats, the synaptosomal free calcium concentration significantly increased in hippocampus, cerebral cortex and hypothalamus of 26–month–old rats. Moreover, the synaptosomal membrane protein–bound Ca^{2+} obviously increased in hippocampus and cerebellum while in the other brain areas examined (cerebral cortex, hypothalamus) decreased significantly. These suggest that the perturbation of normal Ca^{2+} homeostasis appears to be an important factor correlated with aging.

Key words Age, Rat brain, Synaptosome, Ca^{2+}

* State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093